doi 10.3969/j.issn.1674-4500.2017.01.19

临床研究

四氢叶酸与叶酸对亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性人群妊娠结局影响

王纯叶[1],钟婉平[2],黄良喜[3],陈剑虹[1],李文斌[1]
[1]惠州市第一妇幼保健院,广东 惠州 516007;[2]南方医科大学,广东 广州 510515;[3]惠州市中心人民医院,广东 惠州 516007

摘要:目的 比较叶酸和活性叶酸补充对亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性人群妊娠结局影响。**方法** 采用前瞻性随机实验收集我院30~40岁有既往流产史或畸形胎儿史女性并记录实验对象体质量指数。从中筛选MTHFR677 1298基因突变的高风险人群80名,随机分为实验组40名,对照组40名。实验组给予活性三代叶酸800 μg/d,对照组给予叶酸800 μg/d。每周电话回访记录流产、妊娠并发症及妊娠结局例数。**结果** 对照组、实验组年龄、流产次数、基因突变风险等级及服药时长无显著性差异。经过平均40周的电话回访跟踪,对照组孕妇妊娠结局:足月正常胎儿32例、早产儿4例、早孕期流产2例、晚期流产1例;实验组1例中途退出,足月正常胎儿30例、早产儿1例、早孕期流产5例、晚期流产2例。两组娩出活胎均无神经管畸形胎儿及其他结构畸形胎儿。两组妊娠结局经Mann-Whitney *U*检验,P>0.05无统计学差异。**结论** 对于MTHFRC677T、A1298C基因突变高风险人群给予甲基四氢叶酸无明显益处。建议高龄、有不良妊娠结局史女性叶酸每日补充量可由400 μg/d提高至800 μg/d。
关键词:亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性;高风险人群;甲基四氢叶酸;妊娠结局

Methyltetrahydrofolate and folic acid supplementation in methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms: a randomized controlled trial

WANG Chunye[1], ZHONG Wanping[2], HUANG Liangxi[3], CHEN Jianhong[1], LI Wenbin[1]
[1]First Maternity and Child Care of Huizhou, HuiZhou 516007, China; [2]South Medical University, Guangzhou 510515, China; [3]The Center People's Hospital of Huizhou, HuiZhou 516007, China

Abstract: Objective Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298 Cpolymorphismsreduce the ability of synthesis methyltetrahydrofolate. So the methyltetrahydrofolate supplement pregnancy outcome was compared tothe folic acid supplement in methylenete trahydrofolate reductase polymorphisms. **Methods** The 80 participants were women with recurrent abortion, aged 35 to 40 years, methy lenetetrahy drofolate reductase C677T and A1298 Cpolymorphisms. The cases were randomly assigned to receive either folic acid or methyltetrahydrofolateaccording to the stratified blocked randomization by age, the number of previous abortions and methylenetetrahydrofolate reductasepolymorphisms. Participants took daily 800 μg methylentetrahydrofolate or 800 μg folic acid from at least 12 weeks before conception to the 24 th week of the pregnancy. Pregnancy complications and preganacy outcome of two groups were followed-up. **Results** After an average of 40 weeks of tracking, 32 cases of pregnant women in the folic acid group delivered their babies full term, 4 cases premature delivery, 2 cases early miscarriage and 1 case late abortion. In the methylenetetrahydrofolate group, a case was dropped, 30 cases of pregnant women delivered their babies full term, 5 cases premature delivery, 2 cases early miscarriage, 1 case late abortion. There was no significant difference in preganacy outcome between two groups. **Conclusion** The results don't support any beneficial effect of 5-MTHF and folate supplementation inwomen with recurrent abortion with any MTHFR C677T and/or A1298C polymorphism.
Keywords: methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms; people of high risk; methyltetrahydrofolate; pregnancy outcome

叶酸维持细胞正常功能,足量的叶酸在预防胎儿神经管畸形及复发性流产方面起非常重要作用[1]。叶酸本身没有治疗作用,需要在体内经亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)还原成5-甲基四氢叶酸(5-MTHF),参与调解同型半胱氨酸水平、一碳单位供给,促进胎儿神经管发育、防止流产等作用[2]。而MTHFR基因C677T和A1298C基因等位点的多态性影响着其编码酶的活性、血清和红细胞叶酸浓度、血浆同型半胱氨酸浓度、NTDs及复发性流产风险[3-7]。677T基因型是发生习惯性流产及胎儿神经管发育异常的高危因素[8],677TT基因型孕妇流产风险增加2.54倍,298CC基因型孕妇,流

收稿日期:2016-10-18
基金项目:惠州市科技计划项目(20160810)
作者简介:王纯叶,主管药师,E-mail: happychywang@163.com

产风险增加2.23倍[9]，在中国人群中，携带有677T基因突变人较多[10]。2013年高利洁[11]发表惠州地区MTHFR基因677多态性数据与北方其他地区有差别。

以上研究表明MTHFR基因C677T和A1298C呈多态性分布，有地区区域性特点。该基因多态性影响育龄期女性叶酸代谢，可能对于高风险人群目前日剂量400 μg叶酸补充无法降低不良妊娠发生风险及同型半胱氨酸水平[12]。补充活性叶酸5-MTHF可能降低MTHFRC677T和A1298C高风险人群不良妊娠结局发生率。近年对于MTHFR基因C677T和A1298C基因多态性分布与出生缺陷及复发性流产关系研究较多，但是基于不同区域给予高风险人群补充5-MTHF研究甚少。目前市面上出现基因公司推出的活性叶酸产品，为此我们收集惠州地区MTHFR高风险人群，采用前瞻性随机对照试验，比较叶酸和5-MTHF在高风险人群中妊娠结局效果。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2016年1~10月有妊娠意愿前来我院门诊咨询女性。纳入标准：(1)年龄30~40岁；(2)有流产史或有畸形胎儿史；(3)同意签署基因测定同意书。通过门诊检查排除夫妻双方染色体异常、生殖道异常、内分泌疾病(糖尿病、甲状腺功能异常、多囊卵巢综合征、高泌乳素血症等)、自身免疫性疾病(抗磷脂综合征、系统性红斑狼疮等)、原有高血压、或其他心肝肾异常患者。从中筛选MTHFR677 1298基因突变的高风险人群80名，基因突变高风险人群包括677等位基因CT或TT,1298基因AC或CC任一等位基因，记录参与对象的体质量指数，随机分为实验组40名，对照组40名。

1.2 方法

(1)基因筛查是抽取实验对象静脉血4 mL，置于肝素抗凝血管中，−20 ℃保存。根据DNA抽提试剂盒操作说明，测定MTHFRC677T和A1298C两个基因位点，采取连接酶检测反应法进行基因分型；(2)叶酸干预实验组给予活性叶酸800 μg/d，对照组给予叶酸800 μg/d；两组药物剂量是根据Tempfer[13]设定。服药时长为计划怀孕孕前3月~孕3月，孕中后期根据风险评定给予相应剂量补充；(3)观察指标及试验跟踪回访叶酸补充期间每周电话回访确认两组实验对象未服用其他富含叶酸的营养补充剂。记录试验期间两组早产、足月生产、流产例数、妊娠并发症及其他妊娠结局。

1.3 统计学方法

利用SPSS20.0统计学软件处理结果。计量资料采用均数±标准差表示，两组间比较采用t检验。计数资料采用Mann-Whitney U检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

(1)分组结果对照组、实验组年龄、流产次数及服药时长采用计量资料t检验，$P=0.705$，两组无统计学差异(表1)；基因突变风险等级采用计数资料Mann-Whitney U检验，$P=0.818/0.699$，两组无统计学差异(表2)；(2)妊娠结局经过平均40周的跟踪，对照组孕妇妊娠结局足月正常胎儿32例、早孕期流产2例、晚期流产1、早产儿4例；实验组1例中途退出，足月正常胎儿30例、早孕期流产5例、晚期流产2、早产儿1例。两组娩出活胎均无神经管畸形胎儿及其他结构畸形胎儿。两组妊娠结局经Mann-Whitney U检验，$P>0.05$，无统计学差异(表3)。

表1 实验组对照组计量因素比较(n=40)

因素	叶酸组	MTHF组
年龄(岁)	35.6±4.5	35.6±5.0
BMI(kg/m^2)	25.8±3.5	26.1±4.1
既往流产(次)	2.1±0.7	2.1±0.5
服药时长(周)	27.3±1.2	27.4±0.8

表2 实验组对照组基因多态性因素比较(n=40)

MTHFR基因		叶酸组	MTHF组
MTHFR677CT	C/C	20	19
	C/T	16	17
	T/T	4	4
	Mann-Whitney U	P=0.818	
MTHFR1298AC	A/A	26	26
	A/C	9	10
	C/C	5	4
	Mann-Whitney U	P=0.699	

表3 实验组对照组妊娠结局

妊娠结局	叶酸组(n=40)	MTHF组(n=39)
足月正常胎儿	32	30
早产儿	4	5
早期流产	2	2
晚期流产	1	1
Mann-Whitney U	P=0.751	

3 讨论

MTHFR是叶酸代谢通路中的关键酶。该酶相关基因位点多态性也被证实与编码酶的活性、叶酸浓度、血浆同型半胱氨酸浓度密切相关[14]。临床试验显示，在叶酸摄入量无显著性差异的情况下，血清叶酸水平677 TT比TC、CC型个体的血清叶酸水平低20%左右[15]；在血叶酸浓度低时，MTHFR677 TT型同型半胱氨酸水平比CC、CT型高30%左右[16]。MTHFR相关基因位点基因型分布在部分中国女性人群中的研究表明，MTHFR677TT基因型在中国北方和南方的比例相差27%左

右,而在北方和南方内部各省差异较少(北方相7%左右、南方相差2%左右);中国北方 MTHFR1298 CC基因型的比例较南方低4.10%[8]。所以基于惠州本地区MTHFR 677TT/1298CC基因多态性中的高风险人群研究是必要。

随着基因检测指导下的个体化药学发展,临床药师参与产前个体化用药,开展了本次基于惠州地区MTHFR677 1298基因突变的高风险人群研究,研究对象为80例,随即分为实验组和对照组,两组实验对象影响结果的因素条件无统计学差异,包括年龄、体质量指数、既往流产次数、服用叶酸时长及MTHFR677 1298基因风险。两组妊娠结局经小样本的计数统计方法Mann-Whitney U 检验,无显著性差异(P=0.751)。Azita[17]报道阿富汗地区育龄期女性随即双盲对照试验验证给予5-MTHF是否比叶酸对于MTHFR677 1298高风险人群更有益处。结果两组流产例数、体内叶酸及半胱氨酸浓度无显著性差异。结论为5-MTHF较叶酸并不能给MTHFR677 1298高风险人群带来较多益处。其与本实验主要不同点为纳入的实验对象为阿富汗地区育龄期女性,叶酸和5-MTHF补充量为1000 μg/d。不同地区人群MTHFR677 1298基因突变类型不同,既使惠州地区与国内北方地区MTHFR677 1298多态性也有差别[12]。另外各国地区对于育龄期女性叶酸补充量不同,我国对于正常人群推广400 μg/d。本实验给予800 μg/d是基于Tempfer CB[14]设定、国内有关复发性流产与叶酸关系研究[18-21]及国内制剂规格而定。MTHFR677 1298基因突变降低合成5-甲基叶酸的能力,实验当中补充800 μg/d叶酸是国家推荐400 μg/d的2倍,这一剂量增加MTHFR底物量,可能提高四氢叶酸还原酶的还原活性,进而增加体内5-MTHF含量,起到避免不良妊娠结局作用。而市售5-甲基四氢叶酸目前价格较合成叶酸昂贵,多是由基因公司宣传销售,无法推广为育龄期女性免费服用优生优育药品。目前我国二胎政策已于2016年1月1日正式开放,高龄孕产妇数目显著增加,为保证优生优育,建议高龄、有不良妊娠结局史女性叶酸每日补充量可由400 μg/d提高至800 μg/d。

参考文献:

[1] Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folatemetabolism with special references to cardiovascular disease andneural tube defects[J]. J Inherit Metab Dis, 2011, 34(1): 75-81.

[2] Jardine MJ, Kang A, Zoungas S, et al. The effect of folic acidbased homocysteine lowering on cardiovascular events in People withkidney disease: systematic review and meta-analysis[J]. BMJ, 2012, 34(8): e3533-7.

[3] 韩红敬, 沈 浣, 王艳槟, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因677位多态性, 高同型半胱氨酸与复发流产[J]. 生殖与避孕, 2012, 32(7): 486-9.

[4] Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications,and adverse pregnancy outcomes: the hordaland homocysteine study[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(4): 962-8.

[5] Bergen NE, Jaddoe VW, Timmermans S, et al. Homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcomes: the Generation R Study[J]. Inter J Obstetr Gynaecol, 2012, 119(6): 739-51.

[6] Furness D, Fenech M, Dekker G, et al. Folate, vitamin B12, vitamin B6 and homocysteine: impact on pregnancy outcome[J]. Matern Child Nutr, 2013, 9(2): 155-66.

[7] Kim MW, Ahn KH, Ryu KJ, et al. Preventive effects of folic acidsupplementation on adverse maternal and fetal outcomes[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97273-8.

[8] 贺宪民, 张 群, 杨 琦, 等. 四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 15(1): 13-8.

[9] Farah P, Moni Ta, Suraksha A. Polymorphism in MTHFR, MTHFD, and PAI-1 and recurrent miscarriage among north India women[J]. Arch Gynecol Obstet, 2013, 288(4): 1171-7.

[10] Yang B, LiuY, Li Y, et al. Geographical distribution of MTHF C677T, A1298C and MTRR A66G gene polymorphisms in China: findings from 15357 adults of Han nationality[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e57917-21.

[11] 高利洁, 鲁衍强, 芮欣忆, 等. 惠州汉族女性亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成还原酶的基因多态性分布[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2013, 34(1): 140-3.

[12] Krista SC, Zhu JH, Ling H, et al. MTHFR677CT genotype is associated with floate and homocysteine concentrations in a large population-based, doubled-blined trial of folic acid supplementation [J]. Am J Clin Nutr, 2011, 93(6): 1365-72.

[13] Tempfer CB, Kurz C, Bentz EK, et al. A combination treatment of prednisone, aspirin, folate, and progesterone in women with idiopathic recurrent miscarriage:a matched-pairstudy [J]. Fertil Steril, 2006, 86(1): 145-8.

[14] Khosravi F, Zarei S, Ahmadvand NA, et al. Association between plasminogen activator inhibitor 1 gene mutation and different subgroups of recurrent miscarriage and implantation failure[J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(1): 121-4.

[15] Nishio K, Goto Y, Kondo T, et al. Serum folate and methylenetetra-hydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake[J]. J Epidemiol, 2008, 18(3): 125-31.

[16] de Bree A, Verschuren WM, Boke AL, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase677C→T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sampl[J]. Am J Clin Nutr, 2003, 77(3): 687-93.

[17] Azita H, FarhadV, ZahraY, et al. Methyltetrahydrofolate vs folic acid supplementation in idiopathic recurrent miscarriage with respect to methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms: a randomized controlled trial[J]. PLoS One, 2014, 10(12): 1-12.

[18] 熊 雯, 谢 聪, 黄 娟, 等. 复发性流产患者叶酸代谢水平及叶酸干预对妊娠影响研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(1): 77-80.

[19] 速存梅. 育龄妇女血清和红细胞叶酸水平与不良妊娠结局的相关性分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(2): 241-3.

[20] 张 爽, 鲁衍强, 芮欣忆, 等. 不同5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因型人群叶酸补服效果评价[J]. 天津医药, 2013, 41(7): 628-31.

[21] Luo J, Sivaraamank, Nouh A, et al. Elevatedplasmalevel of homoeysteinel indepent risk factor for peripheralneuropathy [J]. British J Med Res, 2014, 4(1): 161-9.